
DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2006 Thomson Derwent. All rts. reserv.

007670710 **Image available**

WPI Acc No: 1988-304642/198843

**Printed circuit board material with high workability - contains
insulation board composed of layer made with polyphenylene oxide resin
compsn. contg. crosslinkable polymer and/or monomer**

Patent Assignee: MATSUSHITA ELECTRIC WORKS LTD (MATW)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 63224940	A	19880920	JP 8759719	A	19870315	198843 B
JP 93064586	B	19930914	JP 8759719	A	19870315	199339

Priority Applications (No Type Date): JP 8759719 A 19870315

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 63224940	A		9		
JP 93064586	B		10	B32B-027/04	Based on patent JP 63224940

Abstract (Basic): JP 63224940 A

Printed circuit board contains an insulation board which is composed of a layer made with a polyphenylene oxide resin comps. contg. a polyphenylene oxide, a crosslinkable polymer and/or a crosslinkable monomer, and an inorganic filler, and a layer of a base material impregnated with a resin but not the polyphenylene oxide resin comps.

Polyphenylene oxide is pref. poly (2,6-dimethyl-1,4-phenylene oxide), etc. Crosslinkable polymer is 1,2-polybutadiene, styrene-butadiene copolymer, etc. Crosslinkable monomer is tri-allycyanurate and/or triallyisocyanurate, etc. Inorganic filler is Al oxide, SiO₂, TiO₂, etc. Base material is cloth of glass, aramid, polyester, etc. Resin for impregnation is epoxy resin, polyimide resin, etc.

USE/ADVANTAGE - The material is useful for printed-circuit boards applicable in UHF and SHF bands. The printed-circuit board is superior in permittivity (i.e., 10.8 (1M Hz) in contrast to 9.8 using copper clad alumina insulation base board), and workability for drilling, etc.

Derwent Class: A18; A25; A85; L03; P73; V04

International Patent Class (Main): B32B-027/04

International Patent Class (Additional): B32B-015/08; C08J-005/24;

H05K-001/03

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-64586

(43)公開日 平成5年(1993)3月19日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/24		7823-4B		
1/20	A	7236-4B		
// (C 1 2 N 9/24				
C 1 2 R 1:07)				
(C 1 2 N 1/20				

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-254498

(22)出願日 平成3年(1991)9月6日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成3年3月15日
社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌65巻
03号講演要旨集」に発表

(71)出願人 000195524

生化学工業株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号

(72)発明者 中島 佑

宮城県仙台市泉区加茂2丁目9番地1

(72)発明者 丸山 稔

群馬県沼田市栄町208番地10

(72)発明者 一島 英治

宮城県仙台市太白区郡山6丁目5番10号

406

(74)代理人 弁理士 野沢 睦秋 (外1名)

(54)【発明の名称】 α -1, 2-マンノシダーゼ、その製造方法およびその生産菌

(57)【要約】

【構成】 バチルス属の細菌から生産される α -マンナンなどの α -1, 2-マンノシド結合を含有する多糖またはオリゴ糖の α -1, 2-マンノシド結合に特異的に作用する新規な酵素 α -1, 2-マンノシダーゼ。

【効果】 公知の α -1, 2-マンノシダーゼより培養および精製が容易であり、 α -マンナンの構造決定のための生化学試薬として、マンノシドーシスの診断或いは治療のため、更には酵母表層を覆っているマンナン類を改変してその物性を変化させることで種々の酵母を利用する生産技術の発展を図るためなどに有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の理化学的性質を有する新規酵素 α -1, 2-マンノシダーゼ;

①作用

(a) α -1, 2-マンノシド結合を含む α -マンナンまたはオリゴ糖を基質とした場合、該糖類の非還元末端位の α -1, 2-マンノシド結合を特異的に加水分解してマンノースを遊離する。

(b) マンノースを基質とした場合、マンノースの脱水縮合によって α -1, 2-マンノシド結合を含むオリゴ糖を生成する。

②基質特異性

(a) α -マンナンに対しては、 α -1, 2-マンノシド結合からなる側鎖を非還元末端から加水分解するが、非還元末端部位が α -1, 3-マンノシド結合である側鎖または α -1, 6-マンノシド結合からなる主鎖を加水分解しない。

(b) α -1, 2-マンノピオースを加水分解するが、 α -1, 3-マンノピオースまたは α -1, 6-マンノピオースには実質的に作用しない。

(c) α -1, 2-マンノシド結合のみからなるマンノースオリゴ糖を加水分解するが、非還元末端部位が α -1, 3-マンノシド結合であるマンノースオリゴ糖には実質的に作用しない。

(d) p-ニトロフェニル- α -D-マンノシドには実質的に作用しない。

(e) β -マンノシド結合には作用しない。

(f) 可溶性澱粉を加水分解しない。

③至適 pH

5.5~7.0

④安定 pH 範囲

5.0~8.0

⑤至適温度

40~50℃

⑥安定温度範囲

40℃以下

⑦阻害および活性化

エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、 Hg^{2+} によって阻害され、 Ca^{2+} によって僅かに活性化される。

【請求項2】 バチルス属に属し、 α -1, 2-マンノシダーゼ生産能を有する細菌を培養し、その培養物から α -1, 2-マンノシダーゼを採取することを特徴とする α -1, 2-マンノシダーゼの製造方法。

【請求項3】 α -1, 2-マンノシダーゼ生産能を有するバチルス sp. M-90 菌株

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は α -マンナンなどの α -1, 2-マンノシド結合を含有する多糖またはオリゴ糖の α -1, 2-マンノシド結合に特異的に作用する新規

な酵素 α -1, 2-マンノシダーゼ、その製造方法およびその生産菌に関するものである。

【0002】 α -1, 2-マンノシダーゼは α -マンナンの α -1, 2-マンノシド結合に特異的に作用することから、酵母マンナンをはじめ多くの α -マンナンの構造決定のための生化学試薬として、或いはヒトの糖代謝の異常により起こされる遺伝病で尿中にマンノースを含むオリゴ糖を排泄するマンノシドーシスの診断或いは治療のため、更には酵母表層を覆っているマンナン類を改変してその物性を変化させることで種々の酵母を利用する生産技術の発展を図るためなど多くの用途が考えられる。

【0003】また、加水分解の逆反応(脱水縮合反応)を利用して α -1, 2-マンノシド結合を含む高マンノース型オリゴ糖の合成への利用も考えられる。

【0004】

【従来の技術】微生物から生産される α -マンナンの α -1, 2-マンノシド結合に作用する酵素 α -1, 2-マンノシダーゼとして例えばアスペルギルス属に属する糸状菌由来のものが知られている(特開昭57-54588号公報参照)。

【0005】この従来知られているアスペルギルス属に属する糸状菌由来の酵素 α -1, 2-マンノシダーゼは前記用途に供することが可能で有用であるが、更に酵素活性が強く、精製も容易である新規な α -1, 2-マンノシダーゼが求められている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明が解決しようとする課題は、従来知られている公知の α -1, 2-マンノシダーゼは酵素活性が弱く、培養および精製が容易でない、という点である。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、前記課題を解決するためになされたもので、 α -マンナンなどの α -1, 2-マンノシド結合を含有する多糖またはオリゴ糖の α -1, 2-マンノシド結合に特異的に作用する新規な酵素 α -1, 2-マンノシダーゼ、その製造方法およびその生産菌を提供するものである。以下に本発明を詳しく説明する。

【0008】本発明である酵素 α -1, 2-マンノシダーゼの生産に用いる微生物は、本酵素の生産能を有するバチルス属細菌であればいずれの菌株でもよいが、殊に、本発明の実施例に用いたバチルス(Bacillus) sp. M-90 菌株は本発明者らが酵母マンナン資化性菌(酵母マンナンを主炭素源とする培地に生育可能で、培地中の酵母マンナンを分解する菌)の検索によって宮城県下の土壌から分離した新菌株であり、その菌学的性質は次の通りである。

【0009】(イ)形態学的性質

グラム染色性 : 陽性

細胞の形状（大きさ）：桿菌（長径0.5～0.7 μm ×短径0.2～0.3 μm ）
運動性の有無：有り（周鞭毛）
胞子形成：陽性（芽胞染色および電子顕微鏡にて確認された）

【0010】（ロ）各培地における生育
肉汁寒天平板培養（栄養寒天培地）

〔24時間後〕淡黄色、透明できわめて小さい。
〔数日後〕淡黄色、透明で、円形、表面は滑らかで薄い凸状態で培地の表面にだけ生育していた。

【0011】（ハ）生理学的特性
カタラーゼ生産能力：陽性
オキシターゼ生産能力：陰性
酸素に対する態度：好氣的

【0012】（ニ）生育温度
好適生育温度は30℃前後であり、温度が下がって25℃になると生育が遅くなり、温度が上がって37℃になると生育が困難となった。

【0013】このような菌学的性質を有するM-90株の分類学上の位置を、バージェイズ・マニュアル・オブ・システムテック・バクテリオロジー（第1版、第2巻（1986年））を参照して検討すると、本菌は運動性を有する好気性グラム陽性桿菌で芽胞を形成して α -1, 2-マンノシダーゼ生産能を有していることから、バチルス属の新菌株と判定された。

【0014】尚、このM-90株は工業技術院微生物工業技術研究所に微生物受託番号、微工研菌寄第12439号（FERM P-12439）として寄託されている。

【0015】本発明の新規な α -1, 2-マンノシダーゼは、該酵素を生産するバチルス属の細菌を適当な培地に接種して培養し、培養後の培養物（液体培養の時は培養液）から菌体を分離除去し（遠心分離、凝集分離、濾過など）、次いで一般的な酵素の分離精製法（例、「入門酵素化学」、昭和48年7月1日、（株）南江堂発行参照）を適用することによって必要とされる精製度の酵素標品として採取される。

【0016】前記バチルス属細菌の培養は、該菌が資化可能な炭素源（酵母マンナンなど）、窒素源（酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー、大豆粕などの有機窒素源；硫酸、尿素、硝酸アンモニウムなどの無機窒素源）、無機塩（鉄、マグネシウム、カルシウム、カリウムなどの硫酸塩、リン酸塩、塩酸塩など）などを含む培地中で好氣的な培養法（振盪培養、攪拌培養、通気培養など）によって生育に適した温度で8時間～数日間培養することによって培地中に酵素を生産させることができる。培養に際し、培地に酵母エキスを添加すると生育が盛んになり、培地単位体積あたりの酵素活性を上昇させることができる。

【0017】菌体を分離除去した液体培養後の培養液か

ら、例えば硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム等による塩析；エタノール、アセトン、イソプロパノール、テトラヒドロフラン等の有機溶媒による沈澱法；ヒドロキシアパタイト（水酸化リン酸カルシウム）等による吸着クロマトグラフ法；ジエチルアミノエチル（DEAE）基、トリエチルアミノエチル基等の交換基を有する陰イオン交換体等によるイオン交換クロマトグラフ法；アフィニティークロマトグラフ法；ゲル濾過クロマトグラフ法；分子ふるい膜等による限外濾過法；電気泳動法など公知の酵素精製法によって目的とする精製度の酵素標品を得ることができる。

【0018】例えば、バチルス s p. M-90 菌株を酵母マンナンを主要な炭素源とし、酵母エキスを添加した培地中、好氣的条件下で培養した培養液から菌体を分離除去し、次いでDEAE-トヨパール650S（商品名；東ソー（株）製）によるイオン交換クロマトグラフィーおよびトヨパールHW-55F（商品名；東ソー（株）製）によるゲル濾過クロマトグラフィーの各段階を経て精製し、電気泳動的にほぼ均一な精製酵素標品を高収率（培養液中の酵素活性の47%を回収）に得ることができる。

【0019】精製の各段階の粗酵素および精製酵素の α -マンノシダーゼ活性の測定は、酵母マンナンを基質として反応を行い、遊離するマンノース測定することによって行なった。すなわち、酵母マンナン（終濃度0.1%）と酵素液を含む反応液（0.4Mリン酸緩衝液、pH7.0）中、37℃で10分間、反応を行い、反応後マンノースを標準として還元糖をネルソン・ソモジ（Nelson-Somogi）法によって測定したBiochim. Biophys. Acta, 658, 45-53,（1981）参照）。

【0020】酵素活性の単位は、上記反応において1秒間に1モルのマンノースを遊離する酵素量を1カタール（katal；以下「kat」と略す）とした。

【0021】次に本発明の新規な酵素 α -1, 2-マンノシダーゼの理化学的性質を示す。測定は実施例で得られた精製酵素を用いて行なった。

【0022】（1）作用

（a） α -1, 2-マンノシド結合を含む α -マンナン（例えばパン酵母マンナン、清酒酵母マンナン）またはオリゴ糖（例えば前記酵母マンナンの側鎖のオリゴ糖）を基質とした場合、該糖類の非還元末端位の α -1, 2-マンノシド結合を特異的に加水分解してマンノースを遊離する。

【0023】（b）マンノースを基質とした場合、マンノースの脱水縮合によって α -1, 2-マンノシド結合を含むオリゴ糖を生成する。例えば、過剰量（10%）のマンノースを基質として37℃で24時間反応させると α -1, 2-マンノビオースの生成が確認された。

【0024】（2）基質特異性

(a) α -マンナンに対しては、 $\alpha-1, 2$ -マンノシド結合からなる側鎖を非還元末端から加水分解するが、非還元末端部位が $\alpha-1, 3$ -マンノシド結合である側鎖または $\alpha-1, 6$ -マンノシド結合からなる主鎖を加水分解しない。すなわち、最長側鎖として $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ を有するパン酵母の野生株に由来するマンナンと、そのような側鎖のない変異株(X2180-1B4)由来のマンナンを本酵素で分解し、その加水分解物を $^1\text{H-NMR}$ で分析したところ、前者を基質とした場合には上記最長側鎖は分解されなかったが、後者を基質とした場合は側鎖が分解され、 $\alpha-1, 6$ -マンノシド結合からなる主鎖だけが残った。なお、パン酵母(野生株)由来のマンナンを基質として測定したミハエリス定数 K_m は0.02%で、最大速度 V_{\max} は $15\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ であった。

【0025】(b) $\alpha-1, 2$ -マンノビオースを加水分解するが、 $\alpha-1, 3$ -マンノビオースまたは $\alpha-1, 6$ -マンノビオースには実質的に作用しない。即ち、図1に示す $\alpha-1, 2$ -マンノビオース(A)、 $\alpha-1, 3$ -マンノビオース(B)、 $\alpha-1, 6$ -マンノビオース(C)の各基質に本酵素を作用させ、酵素反応による加水分解物を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるゲル濾過によって測定した。その測定結果から $\alpha-1, 2$ -マンノビオースのみを分解することが判る。

【0026】(c) $\alpha-1, 2$ -マンノシド結合のみからなるマンノースオリゴ糖を加水分解するが、非還元末端部位が $\alpha-1, 3$ -マンノシド結合であるマンノースオリゴ糖には実質的に作用しない。

【0027】すなわち、図2に示すパン酵母マンナンの側鎖オリゴ糖混合物[$\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ (D)、 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ (E)、 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ (F)の混合物]に本酵素を作用させて得た加水分解物のHPLCパターンから、EおよびFのみ分解され、Dは分解されないことが判る。

【0028】また、本酵素のマンノテトラオース[$\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ (G)、 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ (H)]に対する作用を比較したところ、Hを加水分解してマンノースを遊離するが、Gは分解しなかった。

【0029】(d) p-ニトロフェニル- α -D-マンノシドには実質的に作用しない。

【0030】(e) β -マンノシド結合には作用しない。

【0031】(f) 可溶性澱粉を加水分解しない。

【0032】(i) 以上の結果から、本酵素は、非還元末端部位の $\alpha-1, 2$ -マンノシド結合を特異的に認識

して作用し、非還元末端から $\alpha-1, 2$ -マンノシド結合をexo型に加水分解すること、および $\alpha-1, 3$ -マンノシド結合、 $\alpha-1, 6$ -マンノシド結合、 β -マンノシド結合、グルコシド結合にはいずれも作用しないことが判る。

【0033】(3) 至適pH

本酵素についてブリトン・ロビンソン(Britton-Robinson)の広域緩衝液を用いて 37°C 、10分間の酵素反応を行い至適pHを調べたところ、図3に示すようにほぼpH5.5~7.0、特にpH6.0付近であった。

【0034】(4) 安定pH範囲

本酵素についてブリトン・ロビンソン(Britton-Robinson)の広域緩衝液を用いて終濃度20mMで、 4°C 、24時間の処理を行なった後、 37°C 、10分間の酵素反応によって残存活性(相対活性)を調べたところ、安定pH範囲は図4に示すようにpH5.0~8.0であった。

【0035】(5) 至適温度

本酵素について $20\sim 60^\circ\text{C}$ の各温度でリン酸緩衝液(pH7.0)中、10分間反応させて至適温度を調べたところ、図5に示すように $40\sim 50^\circ\text{C}$ 、特に 45°C 付近であった。

【0036】(6) 安定温度範囲

本酵素について80mMリン酸緩衝液(pH7.0)中、 $0\sim 50^\circ\text{C}$ の範囲で10分間処理した後、 37°C 、10分間の酵素反応によって残存活性(相対活性)を調べたところ図6に示すように 40°C で安定であった。

【0037】(7) 阻害および活性化

本酵素について無機イオンおよび阻害剤による影響を、これらを反応系に添加して 37°C 、10分間の酵素反応によって調べた。表1に示すようにエチレンジアミン四酢酸(EDTA)によって活性が100%、 Hg^{2+} によって活性が90%阻害され、 Ca^{2+} によって僅かに(10%)活性化される。

【0038】

【表1】

添加物 (1 m M)	活性度 (無添加のものを100)
Cd ²⁺	100
Co ²⁺	100
Fe ²⁺	100
Ca ²⁺	110
Mg ²⁺	93
Zn ²⁺	93
Mn ²⁺	83
Cu ²⁺	61
Ni ²⁺	48
Hg ²⁺	10
EDTA	0
N-エチルマ レイミド	100
デオキマンノ ジリマイシン (1,10,100 μM)	100

【0039】(8) 分子量

本酵素についてSDS-PAGE（ラウリル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動）法によって分子量を調べたところ、図7に示すとおり約190,000ダルトンであり、ゲル濾過法（図8）によって分子量を調べたところ、約380,000ダルトンであった。なお、SDS-PAGEは常法通り、スラブゲルで5% T（アクリルアミドと架橋剤の総濃度%（W/V））で行なった。ゲル濾過はShodex WS-803F（昭和電工（株）製）カラムを用いてHPLC法で行なった。

【0040】なお、図7および図8から明らかなように実施例で得られた本酵素は、SDS-PAGEで単一のバンドを示し、ゲル濾過で単一のピークを示したことから単一の酵素蛋白として精製されたことが判る。

【0041】(9) 等電点

本酵素について等電点（pI）を等電点電気泳動法によって求めたところpIは3.6であった。pIの測定は、水平型泳動装置（BIO-RAD社製）を使用し、0.04mmポリアクリルアミドゲルで、6w定電力で泳動させ、pIマーカーと比較することによって行なった。

【0042】(10) アミノ酸分析

本酵素をSDS-PAGEによって精製した後、PVD F膜に転写し、気相シーケンサでN-末端のアミノ酸配列を以下の（1）または（2）に示す通り決定した。尚、式中、Xaaはアミノ酸の種類が不明であることを示す。

【0043】(1) Gly Ala Gly Val

Ala Phe Tyr XaaXaa Phe

(2) Gly Ala Gly Val Ala Phe Tyr XaaXaa Ile

【0044】(11) 保存安定性

本酵素は、水溶液の状態で4℃において少なくとも3カ月、凍結乾燥の状態で-20℃において1年以上安定であった。

【0045】

【実施例】次に実施例により本発明を更に詳しく説明するが、この実施例は本発明の一例を示すものであり、これに限定されるものではない。

【0046】パン酵母マンナン2g、硫酸アンモニウム[(NH₄)₂SO₄]500mg、硫酸第二鉄[Fe₂SO₄]20mg、硫酸マグネシウム[MgSO₄・7H₂O]400mg、塩化カルシウム[CaCl₂・2H₂O]60mg、酵母エキス1g、第二リン酸カリウム[K₂HPO₄]7.54g、第一リン酸カリウム[KH₂PO₄]2.32gに水を加えて1Lとした液体培地（pH7.0）800mlにバチルス sp. M-90菌株（一昼夜培養したもの）を植菌し、40時間好氣的に培養して得られた培養液を遠心分離して菌体を除き、上澄液を0.01Mリン酸緩衝液（pH7.0）に対して12時間透析して粗酵素液を得た。

【0047】透析後の粗酵素液を0.01Mリン酸緩衝液（pH7.0）で平衡化させたDEAE-トヨパール650S（商品名；東ソー（株）製）カラムに吸着させ、0~0.7MのNaClを含む0.01Mリン酸緩衝液（pH7.0）の濃度勾配法により酵素を溶出させた（ステップ1）。

【0048】溶出させた活性画分を集めて、0.01Mリン酸緩衝液（pH7.0）に対して透析を行なった後、0.01Mリン酸緩衝液（pH7.0）で平衡化させたDEAE-トヨパール650Sカラムに吸着させ、0.15MのNaClを含む0.01Mリン酸緩衝液（pH7.0）、150mlでカラムを洗浄し、0.15~0.5MのNaClを含む0.01Mリン酸緩衝液（pH7.0）の濃度勾配法により酵素を溶出させた（ステップ2）。

【0049】溶出させた活性画分を集めて、コロジオンバックで濃縮した後、0.01Mリン酸緩衝液（pH7.0）で平衡化させたトヨパールHW-55F（商品名；東ソー（株）製）カラムに負荷し、0.01Mリン

酸緩衝液 (pH 7.0) で酵素を溶出させる (ステップ 3)。

【0050】溶出させた活性画分を集めて、0.01M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化させたハイドロオキシアパタイトカラムに吸着させ、0.01~0.3M のリン酸緩衝液 (pH 7.0) 濃度での濃度勾配法により酵素を溶出させて精製酵素を得た (ステップ 4)。こ

の酵素標品はゲル濾過的および SDS-PAGE 的に均一な酵素蛋白である。

【0051】得られた精製酵素についての各精製ステップ毎の酵素活性、蛋白量、収率などを表 2 に示す。

【0052】

【表 2】

精製段階	全蛋白量 (mg)	総活性 (μ KAT)	比活性 (mKAT/Kg)	精製度 (倍)	収率 (%)
培養溶液	93	1.3	14	1.0	100
ステップ 1	8.7	1.0	120	8.6	81
ステップ 2	6.0	0.35	140	10	66
ステップ 3	2.4	0.59	250	18	47
ステップ 4	1.2	0.3	250	18	23

【0053】表 2 によれば、ステップ 3 とステップ 4 とにおける比活性に変化がなく、このことから、精製はステップ 3 の段階でほぼ終了していることが判る。また、ステップ 4 で酵素が濃縮されたことが判る。

【0054】

【発明の効果】本発明によると、従来知られているアスペルギルス属由来の公知の酵素に比べて酵素活性が数十倍高く、酵母マンナンに対する親和性が高く、保存安定性の優れた新規な α -1, 2-マンノシダーゼを提供することができる。

【0055】また、本酵素はバチルス属の細菌を液体培養することによって培地中に生産できるので、アスペルギルス属の糸状菌を固体培養または液体培養して製造される公知の酵素より培養および精製が容易である。

【0056】更に、本酵素は、 α -1, 2-マンノシド結合を含有する多糖またはオリゴ糖を加水分解する目的だけでなく、本酵素の逆合成反応を利用する高マンノース型オリゴ糖の調製についてもその活用が期待される。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明である酵素の α -1, 2-マンノシド結合を有するマンノピオース (A)、 α -1, 3-マンノ

シド結合を有するマンノピオース (B)、 α -1, 6-マンノシド結合を有する α -マンノピオース (C) についての経時的な分解能力を示す高速液体クロマトグラフィによる測定曲線図である。

【図 2】本発明である酵素のパン酵母マンナンの側鎖オリゴ糖混合物について経時的な分解能力を示す高速液体クロマトグラフィによる測定曲線図である。

【図 3】本発明である酵素の至適 pH を示す pH-反応活性曲線である。

【図 4】本発明である酵素の安定 pH 範囲を示す pH-残存活性曲線である。

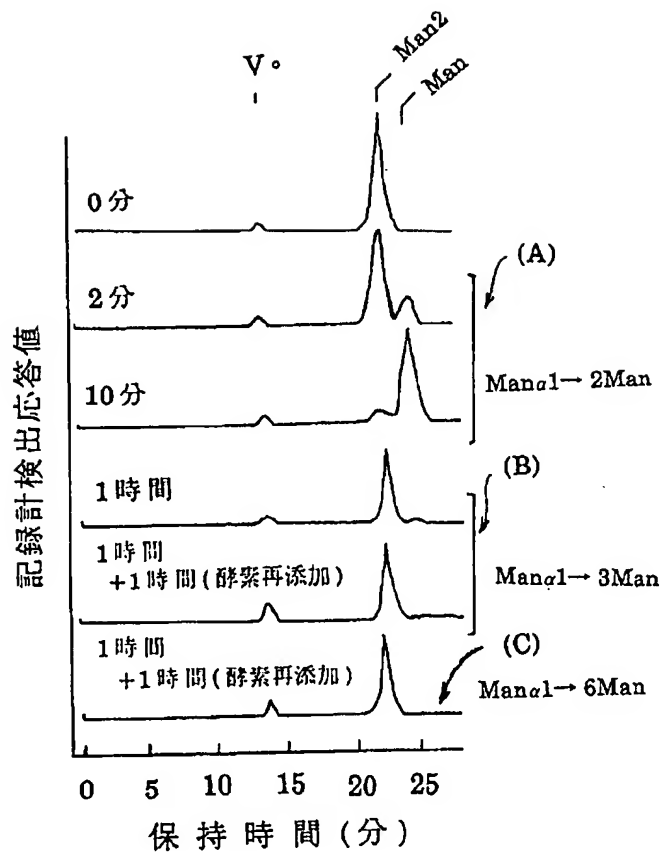
【図 5】本発明である酵素の至適温度を示す温度-反応活性曲線である。

【図 6】本発明である酵素の安定温度を示す温度-残存活性曲線である。

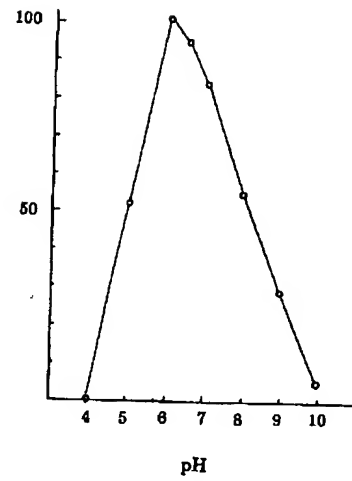
【図 7】本発明である酵素のラウリル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) における展開写真の写生図である。

【図 8】本発明である酵素のショーデックス WS-803 F ゲル濾過図である。

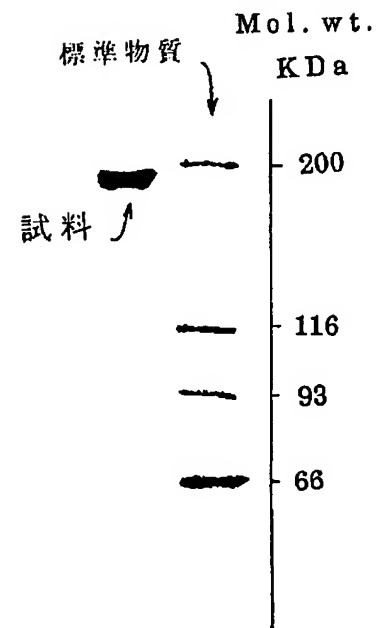
【図1】



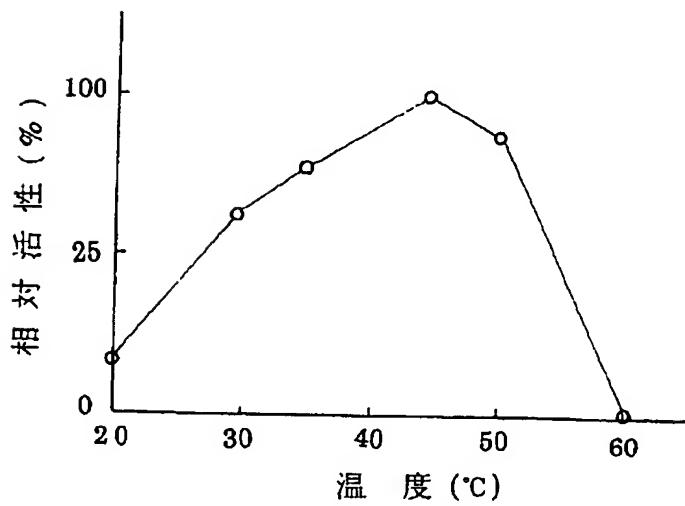
【図3】



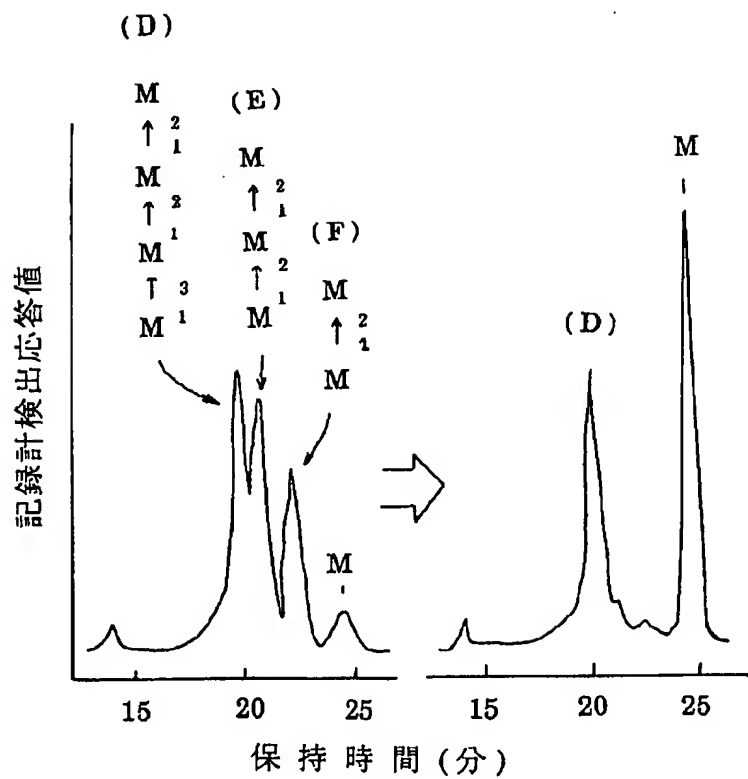
【図7】



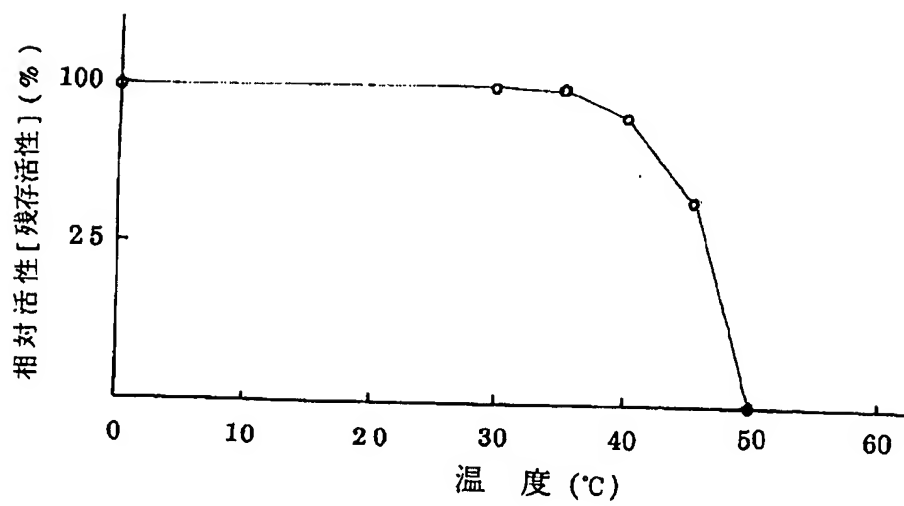
【図5】



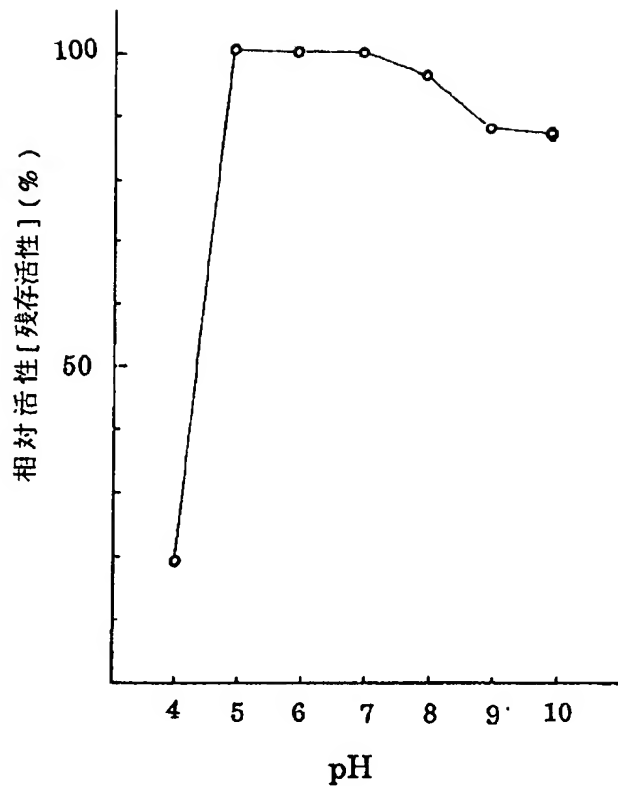
【図2】



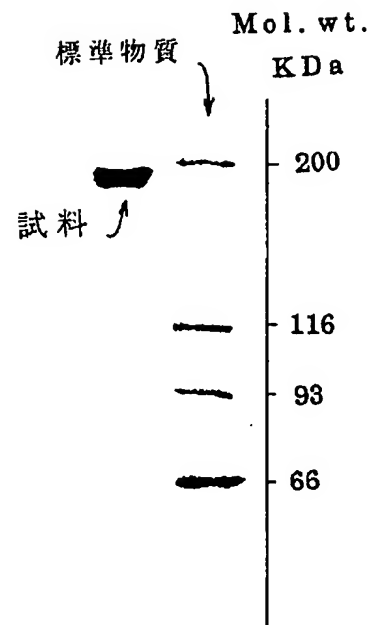
【図6】



【図4】



【図8】



【手続補正書】

【提出日】平成3年9月10日

【手続補正2】

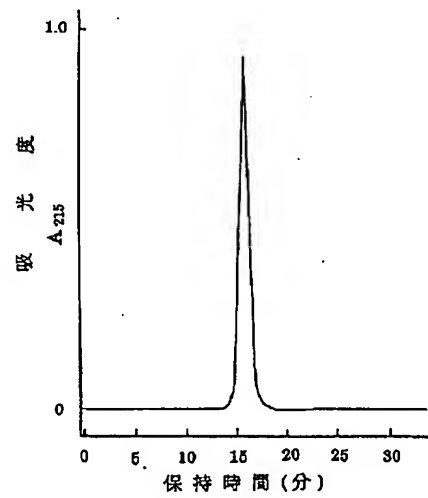
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図8

【補正方法】変更

【補正内容】

【図8】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵

C 1 2 R 1:07)

識別記号

庁内整理番号

F I

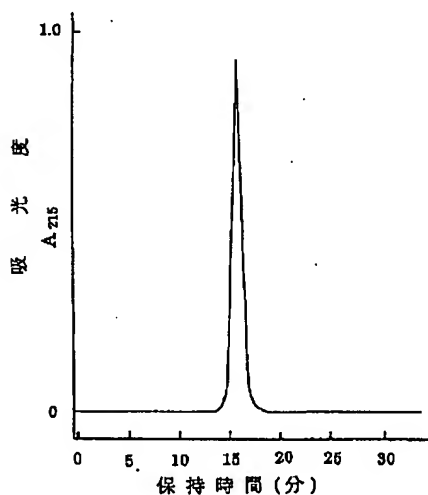
技術表示箇所

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
【部門区分】第1部門第1区分
【発行日】平成11年(1999)12月21日

【公開番号】特開平5-64586
【公開日】平成5年(1993)3月19日
【年通号数】公開特許公報5-646
【出願番号】特願平3-254498
【国際特許分類第6版】

C12N 9/24
1/20
//(C12N 9/24
C12R 1:07)
(C12N 1/20
C12R 1:07)
【F I】
C12N 9/24
1/20 A

【手続補正書】
【提出日】平成3年9月10日
【手続補正2】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図8
【補正方法】変更
【補正内容】
【図8】



【手続補正書】
【提出日】平成10年9月4日
【手続補正1】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】請求項1
【補正方法】変更

【補正内容】
【請求項1】 下記の理化学的性質を有する新規酵素 α -1, 2-マンノシダーゼ;
①作用
(a) α -1, 2-マンノシド結合を含む α -マンナン

またはオリゴ糖を基質とした場合、該糖類の非還元末端位の $\alpha-1, 2$ -マンノシド結合を特異的に加水分解してマンノースを遊離する。

(b) マンノースを基質とした場合、マンノースの脱水縮合によって $\alpha-1, 2$ -マンノシド結合を含むオリゴ糖を生成する。

②基質特異性

(a) α -マンナンに対しては、 $\alpha-1, 2$ -マンノシド結合からなる側鎖を非還元末端から加水分解するが、非還元末端部位が $\alpha-1, 3$ -マンノシド結合である側鎖または $\alpha-1, 6$ -マンノシド結合からなる主鎖を加水分解しない。

(b) $\alpha-1, 2$ -マンノビオースを加水分解するが、

$\alpha-1, 3$ -マンノビオースまたは $\alpha-1, 6$ -マンノビオースには実質的に作用しない。

(c) $\alpha-1, 2$ -マンノシド結合のみからなるマンノースオリゴ糖を加水分解するが、非還元末端部位が $\alpha-1, 3$ -マンノシド結合であるマンノースオリゴ糖には実質的に作用しない。

(d) p-ニトロフェニル- α -D-マンノシドには実質的に作用しない。

(e) β -マンノシド結合には作用しない。

(f) 可溶性澱粉を加水分解しない。

③至適 pH

5.5～7.0

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.